

A COLECÇÃO DE ESTIRPES AUTÓCTONES DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DAS PRINCIPAIS REGIÕES VITIVINÍCOLAS PORTUGUESAS

E. VIEIRA^{1,6}; J. DRUMONDE-NEVES^{1,5}; R. MACHADO¹; P. SILVA¹; A.C. GOMES²; S. SOUSA²; P.T. RAMOS³; F. ALEMÃO³; M.T. LIMA⁵; I. ARAÚJO⁶; F.L. DUARTE³; M.A. SANTOS^{2,4}; M. CASAL¹; D. SCHULLER¹

(1) Centro de Biologia Molecular e Ambiental, Universidade do Minho, Campus de Gualtar, Braga

(2) BIOCANT, Centro de Inovação em Biotecnologia, BIOCANT PARK - Parque Tecnológico de Cantanhede, Cantanhede

(3) Instituto Nacional de Recursos Biológicos, IP, Instituto Nacional de Investigação Agrária, Dois Portos

(4) CESAM e Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Campus Universitário de Santiago, Aveiro

(5) Centro de Investigação de Tecnologias Agrárias – Departamento de Ciências Agrárias, Universidade dos Açores.

(6) Vinalia - Soluções de Biotecnologia para a Vitivinicultura, *Spin-off* da Universidade do Minho, Braga

RESUMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é caracterizada por uma elevada variabilidade fenotípica, que está associada à ocorrência de estirpes em habitats naturais diversificados. Em trabalhos anteriores, demonstrámos a elevada diversidade de estirpes isoladas a partir de ambientes vitivinícolas na Região dos Vinhos Verdes, bem como a ocorrência de estirpes características para cada *terroir*. A recolha de estirpes autóctones foi alargada a outras regiões (Alentejo, Açores, Bairrada, Dão, Douro, Estremadura e Ribatejo), incluindo as castas mais representativas (Alvarinho, Aragonês, Arinto, Avesso, Baga, Bical, Castelão, Loureiro, Maria Gomes, Terrantez, Touriga Nacional e Verdelho). Pelo uso de diferentes marcadores moleculares foram identificadas 662 estirpes a partir dos 4470 isolados recolhidos. A colecção de *S. cerevisiae* de ambientes vitivinícolas é utilizada para a selecção de estirpes mais apropriadas para vinificação e que realçam as propriedades sensoriais características. Adicionalmente, constitui um recurso para a conservação da biodiversidade e partilha de dados genéticos.

Palavras-chave: *Saccharomyces cerevisiae*; Colecção de leveduras; Leveduras autóctones.

1 - INTRODUÇÃO

As leveduras que conduzem a fermentação alcoólica contribuem de forma decisiva para a estrutura, complexidade e individualidade do perfil aromático de vinhos. Estes microrganismos fazem parte da microflora que se encontra na superfície da uva, do interior da adega e de culturas *starter*, também designadas por estirpes industriais ou leveduras secas activas (LSA). Actualmente, existem cerca 200 LSAs e a maioria dos produtores de vinhos na Europa recorrem à sua utilização, uma vez que são considerados factor de garantia para uma fermentação rápida e consistente, e mantêm a homogeneidade de vinhos em anos consecutivos. No entanto, estas leveduras foram maioritariamente obtidas a partir de castas e de regiões vitivinícolas desconhecidas, que não possuem qualquer semelhança

com as tipicidades das castas Portuguesas. O uso de espécies/estirpes autóctones é sempre preferível devido à sua melhor adaptação ao micro-ecossistema e às condições climáticas de cada região, à capacidade de predominância sobre a flora microbiana não desejável, bem como à manutenção das propriedades sensoriais e do perfil característico dos vinhos de cada região. Apesar da sua longa história e tradição enraizada como país produtor de vinhos, em Portugal foram seleccionadas apenas 3 estirpes comerciais de *S. cerevisiae* das regiões vitivinícolas do Vinho Verde, Dão e Bairrada.

Estudos de genómica comparativa, recentemente realizados, revelaram os factores genéticos que moldam a capacidade de adaptação de *S. cerevisiae* a diferentes ambientes e que definem as suas características fenotípicas. A elevada diversidade genómica entre estirpes de *S. cerevisiae* afecta diferentes níveis genéticos, desde a frequência e localização de polimorfismos nucleotídicos até a variabilidade no número de cópias de genes (CARRETO *et al.*, 2008; LITI *et al.*, 2009; SCHACHERER *et al.*, 2009). O grupo de estirpes europeias de vinificação distingue-se das populações de outros continentes pela capacidade de fermentar rapidamente os açúcares do mosto e pela elevada variabilidade fenotípica (LITI *et al.*, 2009). A sequenciação completa do genoma de numerosas estirpes de *S. cerevisiae* de vinificação vai possibilitar a determinação dos factores genéticos envolvidos nas vias metabólicas dos principais compostos aromáticos.

No âmbito de estudos anteriores (SCHULLER *et al.*, 2005; VALERO *et al.*, 2005; VALERO *et al.*, 2007; SCHULLER *et al.*, 2007), foi demonstrada a elevada diversidade genética das estirpes de *S. cerevisiae* e a ocorrência de isolados característicos para diferentes sub-regiões da Região dos Vinhos Verdes. A colecção de estirpes autóctones foi alargada a outras regiões (Alentejo, Açores, Bairrada, Dão, Douro, Estremadura, Palmela e Ribatejo), incluindo as castas mais representativas (Alvarinho, Aragonês, Arinto, Avesso, Baga, Bical, Castelão, Loureiro, Maria Gomes, Terrantez, Touriga Nacional e Verdelho). Esta colecção de estirpes de *S. cerevisiae* constitui um recurso importante tanto para estudos de avaliação e de conservação da biodiversidade, como também para a produção vinhos com aromas diferenciadores.

2 - OBTENÇÃO DOS ISOLADOS DE *S. CEREVISIAE*

A recolha das amostras de uvas foi efectuada ao longo de vários anos em 37 vinhas de 9 regiões vitivinícolas, conforme indicado na Figura 1. Foram colhidos 2kg de uvas em cada um de 6 pontos de amostragem por vinha. Realizaram-se fermentações espontâneas a partir do mosto, a 22°C. Na fase final da fermentação obtiveram-se 30 colónias que foram armazenadas (glicerol, 30%, v/v; -80°C) para posterior extracção de DNA e identificação molecular pelos métodos abaixo mencionados.

Conforme resumido na Tabela 1, colheram-se 623 amostras das principais castas Portuguesas (Alvarinho, Aragonês, Arinto, Avesso, Baga, Bical, Castelão, Loureiro, Maria Gomes, Terrantez, Touriga Nacional e Verdelho), sendo algumas amostragens realizadas nos mesmos locais em anos consecutivos. De todas as amostras colhidas até 2009, 46% (284) realizaram fermentações espontâneas completas, o que permitiu obter 8520 isolados. Até à data foram analisados 4470 isolados, obtendo-se 662 estirpes diferentes de *S. cerevisiae*. A identificação de mais 4050 isolados está actualmente em curso.

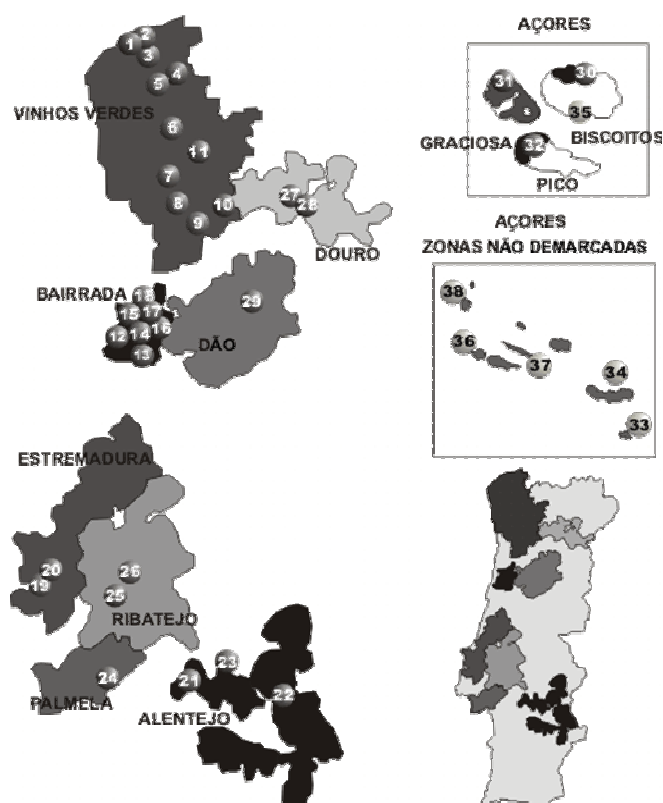


Figura 1 - Locais de amostragem nas diferentes Regiões Vitivinícolas em Portugal continental e ilhas.

Tabela 1 - Resumo das estirpes de *S. cerevisiae* obtidas a partir das amostras recolhidas nas diferentes regiões, para cada casta e ao longo dos anos 2001 a 2009.

Região	Casta	Localização (consoante Figura 1)	Nº de amostras recolhidas	Nº de fermentações espontâneas	Nº de isolados colhidos	Nº de estirpes de <i>S. cerevisiae</i>
Vinhos Verdes	Alvarinho	1, 2, 4	84	42	1260	202
	Avesso	9, 4, 8	78	30	900	145
	Arinto	4, 7	24	7	210	31
	Loureiro	11, 10, 4, 5	72	28	840	120
	Touriga Nacional	4, 10	24	8	240	18
	Total		282	115	3450	516
Bairrada	Baga	12, 15, 18	30	10	300	60
	Bical	12, 14	24	1	30	1
	Maria Gomes	12, 17	24	1	30	19
	Aragonez	12, 13	24	3	90	19
	Touriga Nacional	12, 16	24	7	210	38
	Total		126	22	630	137
Estremadura	Aragonez	19, 20	10	7	210	3
	Arinto	19, 20	11	10	300	1
	Castelão	19, 20	6	6	180	1
	Trincadeira	19	1	1	30	0
	Touriga Nacional	19, 20	10	10	300	4
	Total		38	34	1020	9
Alentejo	Aragonez	21, 22, 23	24	14	420	0
	Trincadeira	21	6	4	120	0
	Touriga Nacional	21	12	6	180	0
	Total		53	34	1020	0
Palmela	Castelão	24	6	5	150	0
	Total		6	5	150	0
Ribatejo	Castelão	25	6	3	90	
	Castelão	26	6	4	120	
	Total		12	7	210	Análise em curso
Douro	Aragonês	27	6	4	120	
	Touriga Nacional	28	6	2	60	
	Total		12	6	180	Análise em curso
Dão	Touriga Nacional	29	6	6	180	
	Total		6	6	180	Análise em curso
Açores (Biscoitos)	Arinto	30	3	2	60	
	Verdelho		2	2	60	
	Híbridos		2	0	0	
	Total		7	4	120	Análise em curso
Açores (Graciosa)	Arinto	31	2	2	60	
	Verdelho		4	4	120	
	Híbridos		8	6	180	
	Total		14	12	360	Análise em curso
Açores (Pico)	Arinto	32	7	6	180	
	Verdelho		4	4	120	
	Terrantez		1	0	0	
	Híbridos		15	10	300	
	Total		27	20	600	Análise em curso
Açores (zonas não demarcadas)	Arinto	33-37	1	0	0	
	Terrantez		3	3	90	
	Verdelho		3	2	60	
	Híbridos		33	14	420	
	Total		40	19	570	Análise em curso
TOTAL			623	284	8520	662

3 - FERMENTAÇÕES ESPONTÂNEAS

O progresso das fermentações espontâneas foi monitorizado pela determinação da diminuição da massa do mosto (libertação de CO₂). As fermentações realizadas com castas recolhidas na Região dos Vinhos Verdes foram realizadas por *S. cerevisiae*. As fermentações de mostos da Bairrada foram realizadas, em alguns casos, por espécies não-*Saccharomyces* (por exemplo *Candida zemplinina*). Esta tendência aumentou para as regiões da Estremadura, Palmela, e Alentejo (sub-região Évora), onde a maioria das fermentações foram realizadas, por exemplo, pelas espécies *C. zemplinina*, *Hanseniaspora uvarum* e *Issatchenkia orientalis*. Apenas em 17% das amostras recolhidas nestas regiões foram encontradas estirpes de *S. cerevisiae*. Exemplos de perfis fermentativos estão representados na figura 2. As fermentações realizadas por estirpes de *S. cerevisiae* demoraram maioritariamente 10 a 15 dias. A velocidade da fermentação não foi dependente do número de estirpes intervenientes, que variava entre 1 a 22 (Figura 2 A e B). As fermentações realizadas por espécies não-*Saccharomyces* decorreram de forma semelhante (Figura 2 D) ou muito mais lentamente (Figura 2 C).

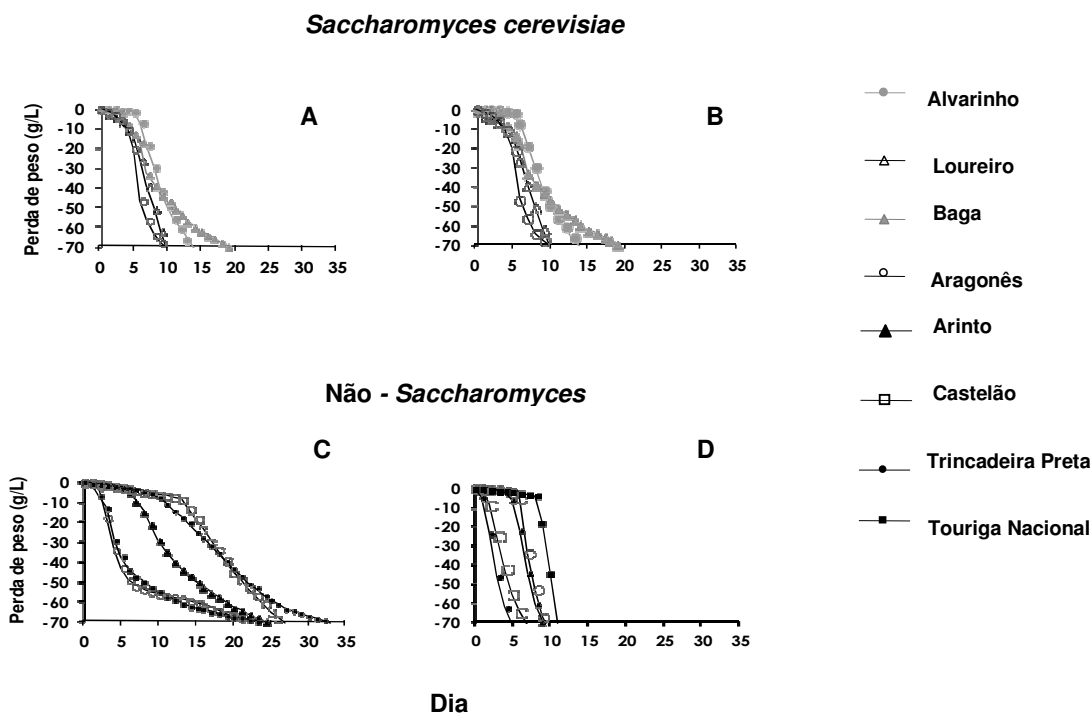


Figura 2 – Exemplos de perfis de fermentações espontâneas realizadas por estirpes de *S. cerevisiae* (A: 1-2 estirpes; B: 12-22 estirpes por fermentação) ou por espécies Não-*Saccharomyces* (C: fermentações lentas; D: fermentações rápidas), em mostos de diferentes castas.

4 - MÉTODOS MOLECULARES PARA A IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

Diferentes métodos podem ser utilizados para a distinção de estirpes de *S. cerevisiae* (análise de microssatélites, sequências interdelta, perfis de restrição de DNA mitocondrial, electroforese em campo pulsado). A tipagem molecular de 23 estirpes comerciais mostrou a equivalência destes métodos (SCHULLER *et al.*, 2004). As sequências delta (300 bp) flanqueiam os retrotransposões TY1 e TY2 ou encontram-se dispersas no genoma de *S. cerevisiae*. São marcadores muito polimorficos (Figura 3 A), uma vez que o seu número e localização apresentam variabilidade intra-específica (LEGRAS e KARST, 2003; SCHULLER *et al.*, 2004). A análise dos perfis de restrição de DNA mitocondrial (Figura 3 B) baseia-se no diferente teor de GC no genoma nuclear e mitocondrial (40% e 20%, respectivamente). Locais de restrição, por exemplo da enzima *HinfI*, que são ricas em GC, encontram-se mais frequentemente no genoma nuclear. Contrariamente, o DNA mitocondrial é digerido em fragmentos maiores e que podem ser visualizados por electroforese. Microssatélites são sequências repetitivas de DNA de 2 a 5 nucleótidos. A amplificação de diferentes locis polimorficos e a sua detecção por electroforese capilar (Figura 3 C) é actualmente o método mais discriminatório para a distinção de estirpes de *S. cerevisiae* (PEREZ *et al.*, 2001; LEGRAS *et al.*, 2005).

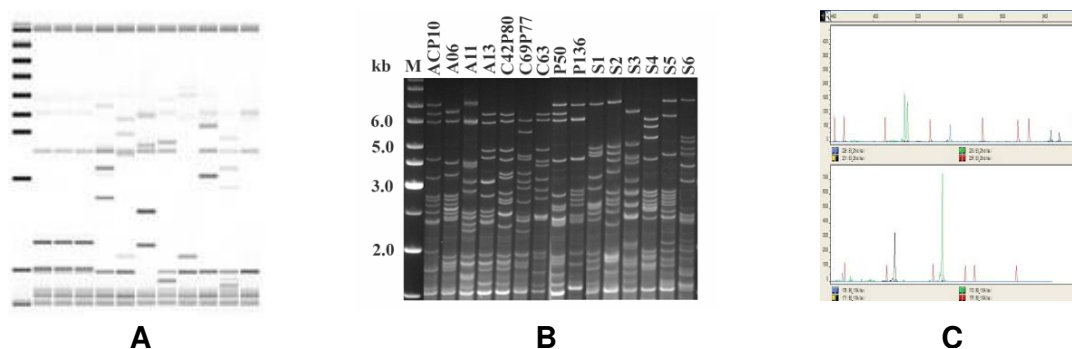


Figura 3 – Exemplos de perfis de sequências interdelta (A); DNA mitocondrial (B) e electroferograma de microssatélites (C) de leveduras vinárias.

Todos os isolados foram caracterizados pela análise de sequências interdelta ou perfis de restrição de DNA mitocondrial. Uma estirpe representativa de cada conjunto de isolados que partilhavam o mesmo perfil, foi ainda analisada quanto à sua combinação alélica de 11 microssatélites polimórficos.

4 - A BASE DE DADOS DE ESTIRPES VÍNICAS DE *S. CEREVISIAE* (*SACCHAROMYCES CEREVISIAE* WINE STRAIN COLLECTION)

A compilação de todos os dados levou à constituição de uma colecção de estirpes autóctones de *S. cerevisiae* (*Saccharomyces cerevisiae* wine strain collection) que integram uma base de dados alojada no *site* (Figura 4), que permite fazer pesquisas as estirpes isoladas consoante a região, casta, ano de isolamento e características genéticas (alelos de microssatélites). Adicionalmente, permite consultar mais informação sobre as castas, regiões, detalhes experimentais e métodos moleculares utilizados. Prevê-se que o número de estirpes aumente ainda com a conclusão das tipagens moleculares de isolados obtidos nas regiões das ilhas dos Açores, Dão, Douro e Ribatejo. Estes materiais podem ser utilizados para a avaliação do seu potencial enológico. Adicionalmente, constituem um recurso importante para estudos de genómica evolutiva e ambiental.

<http://scwsc.bio.uminho.pt>



Figura 4 – *Homepage* da base de dados de estirpes vínicas de *S. cerevisiae*.

5 – CONCLUSÕES

A colecção de estirpes de *S. cerevisiae* é um contributo para a conservação da biodiversidade de leveduras que ocorrem nas principais regiões vitivinícolas Portuguesas. Os trabalhos realizados pretendem contribuir também para a selecção de estirpes mais apropriadas para a vinificação e a manutenção da tipicidade dos vinhos de um determinado local. No futuro próximo, a integração de dados genómicos, proteómicos e metabolómicos de múltiplas estirpes de vinificação vai permitir modelar as interacções entre a casta, a levedura fermentativa e as condições de vinificação no sentido de obter vinhos com o maior potencial aromático possível.

AGRADECIMENTOS

Eugénia Vieira e João Drumonde Neves são recipientes de bolsas de doutoramento SFRH/BDE/33672/2009 (FCT) e M3.1.2/F/006/2008 (DRCT), respectivamente. Este estudo foi financiado pelos projectos POCI/AGR/56102/2004 e PTDC/AGR-ALI/103392/2008 da Fundação para a Ciência e Tecnologia, e recebeu também financiamento do Sétimo Programa-Quadro da Comunidade Europeia (FP7/2007-2013) sob o contrato n.º 232454. Os autores agradecem a todas as empresas e enólogos que apoiaram este estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carreto, L., et al. BMC Genomics, **2008**, 9:524.
Legras, J.L., Karst, F. FEMS Microbiol Lett, **2003**, 221: 249-255.
Legras, J. L., et al., Int J Food Microbiol, **2005**, 102: 73-83
Liti, G., et al. Nature, **2009**, 458(7236):337-341.
Perez, M.A., et al., Lett Appl Microbiol, **2001**, 33: 461-466
Richard, G.F., et al. Res Microbiol, **1999**, 150:589-602.
Schacherer, J., et al. Nature, **2009**, 458(7236):342-345.
Schuller, D., et al. FEMS Microbiol Letters, **2004**, 231:19-26
Schuller, D., et al. FEMS Microbiology Ecology, **2005**, 51: 167-177.
Schuller, D., M. Casal, Antonie Van Leeuwenhoek, **2007**, 91(2): 137-150
Valero, E., et al., FEMS Yeast Research, **2005**, 5: p. 959-969
Valero, E., et al., FEMS Yeast Research, **2007**, 7(2): 317-329